

31.03.98

097580018

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 25 MAY 1998

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1997年10月24日

出 願 番 号

Application Number:

平成 9年特許願第292982号

出 願 人

Applicant(s):

塩野義製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 5月 1日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井寿光

出証番号 出証特平10-3032680

【書類名】 特許願

【整理番号】 A005792

【提出日】 平成 9年10月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/48

【発明の名称】 改良されたナトリウム利尿ペプチド測定用検体採取方法

【請求項の数】 7

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県神戸市長田区御屋敷通3-1-2サントウン御屋敷709

    【氏名】 清水 洋行

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府高槻市南平台5-23-5

    【氏名】 浅田 英久

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府高槻市南平台3-5-18

    【氏名】 遠藤 三朗

【特許出願人】

    【識別番号】 000001926

    【氏名又は名称】 塩野義製薬株式会社

    【代表者】 塩野 芳彦

【代理人】

    【識別番号】 100103230

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 高山 裕貢

    【電話番号】 06-202-2161

【代理人】

    【識別番号】 100108970

    【弁理士】

【氏名又は名称】 山内 秀晃

【電話番号】 06-202-2161

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044602

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 委任状 1

---

【援用の表示】 平成9年10月1日提出の包括委任状

---

【包括委任状番号】 9719404

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 改良されたナトリウム利尿ペプチド測定用検体採取方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳類のナトリウム利尿ペプチドを含有する検体の操作において、検体接触面が該ペプチドの分解物質の活性化を抑制する物質からなる容器を用いることを特徴とする、該検体中の該ペプチドの分解抑制方法。

【請求項2】 ペプチドの分解物質の活性化を抑制する物質がシリコン、ポリプロピレンまたはポリスチレンである請求項1記載の方法。

【請求項3】 哺乳類がヒト、イヌ、ブタ、ラットおよびマウスである請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 ナトリウム利尿ペプチドがBNPである請求項1から3までのいずれかに記載の方法。

【請求項5】 該検体中にアプロチニンを含んでいない請求項1から3記載の方法。

【請求項6】 請求項1記載の方法を含む、哺乳類のナトリウム利尿ペプチドの測定方法。

【請求項7】 哺乳類のナトリウム利尿ペプチド測定のためのキットであって、検体接触面が該ペプチドの分解物質の活性化を抑制する物質からなる容器を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ナトリウム利尿ペプチドを測定、分析、採取、保存する技術に関する。

【0002】

【従来技術】

ナトリウム利尿ペプチドファミリーは、少なくとも心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）およびC型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）の3種類から形成されている。CNPは主に血管内皮か

ら分泌される血管増殖調節ペプチドであるのに対し、ANPおよびBNPは、主として心臓で生合成され、分泌される心臓ホルモンである。それらのペプチドは前駆体として生合成され、成熟型としてヒトにおいてはANPは28アミノ酸からなる $\alpha$ -ANP、BNPは32アミノ酸からなる $\alpha$ -BNP、CNPは22アミノ酸からペプチドがそれぞれ形成される。

ナトリウム利尿ペプチドは様々な疾患により血液中に分泌されるが、ANPの分泌は心房の負荷により亢進されること、BNPは心室への負荷で生合成、分泌が亢進されることから心機能の変化を反映しており、共に心疾患、特に心不全の診断指標として用いられている。現在、ANPとして $\alpha$ -ANPを、BNPとして $\alpha$ -BNPをそれぞれ免疫測定法により血中濃度を測定し、その測定値を診断指標としている。

#### 【0003】

##### 【発明が解決すべき課題】

しかし、 $\alpha$ -ANPおよび $\alpha$ -BNPは採血後、血中のプロテアーゼによる分解を受け易く、極めて不安定であることから、検体の採取方法、保存方法並びに測定までの時間が測定結果に大きく影響する。そこで、正確な測定を行うために、アプロチニン等の分解抑制剤を添加したり、検体を低温に保つなどの操作が行われているが、これらは煩雑であったり、過度の負担を強いるものであった。

そこで、本発明の目的はナトリウム利尿ペプチドを含有する検体の簡便な採取方法を提供することである。

#### 【0004】

##### 【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本発明者らは、種々の検討を重ね、実験を行った結果、検体を採取する容器の検体接触面の材質によりナトリウム利尿ペプチドの分解性が異なることを見出した。このような知見を得て、発明者らは、心疾患の正確な診断のためには、少なくとも検体接触面が硝子性でない容器を使用することにより、従来の煩雑な検体処理が不要になるとの見解に達し、本発明を完成した。

## 【0005】

即ち、本発明は、哺乳類のナトリウム利尿ペプチドを含有する検体の操作において、検体接触面が該ペプチドの分解物質の活性化を抑制する物質からなる容器を用いることを特徴とする、該検体中の該ペプチドの分解抑制方法を提供するものである。

## 【0006】

本明細書中、「哺乳類のナトリウム利尿ペプチド」とは少なくともANPおよびBNPを包含しており、その前駆体およびその誘導体をも包含する。その理由は、血中には成熟型のみならず $\gamma$ -ANPおよび $\gamma$ -BNP等の前駆体並びにその誘導体が存在するからである（BBRC, 214(3), (1995)）。

## 【0007】

本発明において、検体の「操作」とは、採取・保存等の検体を取り扱うあらゆる手段を包含する。

## 【0008】

本発明において、ナトリウム利尿ペプチドに関して、「ペプチドの分解物質の活性化を抑制する物質」とは、採取した検体中に含まれるプロテアーゼなどのペプチド分解物質の活性化を抑制するための物質であって、少なくとも検体採取容器の検体接触面を構成できる物質である。

ペプチドの分解を抑制する物質としてはシリコン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド等を用いることができるがこれらに限定されない。

## 【0009】

シリコンとしては市販されているものを用いることができ、ガラス製およびポリプロピレン製などの一般に用いられている容器をシリコンで被覆する。そのような容器の製造は、当業者既知の方法で行うことができる。本発明における容器には、検体採取容器、保存容器、測定容器などが含まれ、あらゆる用途の容器が包含される。

## 【0010】

本発明の測定検体は、アプロチニンを含んでいても、含んでいなくてもよい。アプロチニンはペプチド分解物質の作用を抑制するため、生体試料中のペプチド

分解物質の作用をより抑えることができるため、アプロチニンを添加することが好ましい。

測定検体は生体試料ならいつでもよく、全血、血清または血漿が好ましい。

【0011】

本発明はまた、哺乳類のナトリウム利尿ペプチド測定方法であって、上記の本発明分解抑制方法を含むことを特徴とする測定方法を提供する。

【0012】

ナトリウム利尿ペプチドの測定方法は液体クロマトグラフィー法又は免疫測定方法などが使用できる。免疫測定方法は競合法又はサンドイッチ法のいずれでもよく、当業者既知の方法で行うことができる。或いは、市販の $\alpha$ -ANP測定キット「シオノリアANP」（塩野義製薬社製）または $\alpha$ -BNP測定キット「シオノリアBNP」（塩野義製薬社製）を用いることができる。

【0013】

本発明はさらに、哺乳類のナトリウム利尿ペプチド測定のためのキットであって、該ペプチド測定用検体の採取方法において、検体接触面が該ペプチドの分解物質の活性化を抑制する物質からなる容器を用い、該検体中の該ペプチドの分解抑制方法を含むことを特徴とするキットを提供するものである。

以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0014】

実施例1 BNPの測定方法

以下の操作において、特に記載の無い限り、試薬は和光純薬またはナカライテスク社の特級試薬を使用した。牛血清アルブミン（BSA）はシグマ社製を使用した。

（1）検体採取容器の製造

市販のガラス管を精製水で1回洗浄し、3%シリコン溶液で3回洗浄する。その後、再度精製水で1回洗浄し、300℃で90分間乾燥する。

【0015】

（2）血漿検体の調製

心疾患患者からEDTA採血管に静脈血を採取し、4℃、×2000gで5分間遠心分離（コクサン社製H-107GA）し、血球分離を行った。検体は使用するまで-80℃で凍結保存した。

【0016】

(3) BNP測定試薬

測定試薬には、以下のペプチド、抗体及びキットを使用した。

- ・ヒト $\alpha$ -BNP（ペプチド研究所社製）
- ・Tyr-ヒト $\alpha$ -BNP（ペプチド研究所社製）
- ・シオノリアBNPキット（塩野義製薬社製）
- ・ $\alpha$ -BNPリング構造部分（112-128）に対する抗体は、特許第2676114号に記載されている方法で作製したKY-BNP-IIを用いた。
- ・ $\alpha$ -BNPカルボキシ末端部分（129-134）に対するモノクローナル抗体は、特許第2665850号に記載されている方法で作製したBC203を用いた。

【0017】

Tyr-ヒト $\alpha$ -BNP（ペプチド研究所社製）の $^{125}\text{I}$ による標識は特願平3-326961に記載された方法と同様にして作製した。

【0018】

(4) IRMA (Immuno Radio Metric Assay) 法によるBNPの測定

上記(2)で保存した心疾患患者由来の血漿をガラス採血管および上記(1)で作製した、シリコンで被膜したガラス採血管に分注後、室温（25℃）にて0、2、6、24時間放置し、BNPの免疫活性をシオノリアBNPキットで測定した。

即ち、各測定検体及び各種標準物質（ $\alpha$ -BNP溶液；0、4、10、150、600、2000pg/ml）をポリスチレン製試験管に100 $\mu$ l分注し、200 $\mu$ lのヨウ化BNP抗体（KY-BNP-II）溶液を添加し、BNP抗体（BC203）固相ポリスチレンビーズを1個加えて攪拌後、4℃で18時間反応した。2mlの洗浄液で2回洗浄を行った後、放射活性を $\gamma$ -カウンターARC-600（アロカ社製）で測定した。



【0019】

(5) 競合系RIAによるカルボキシ末端部分を有するBNPの測定

上記(4)と同様の検体をBNPカルボキシ末端部分を認識する抗体BC203を用いて競合系RIA法で測定した。

各測定検体及び各種標準物質( $\alpha$ -BNP溶液; 0、4、10、150、600、2000 pg/ml)をポリスチレン製試験管に100  $\mu$ l分注した。<sup>125</sup>I-Tyr-ヒト $\alpha$ -BNPおよびBC203抗体溶液を各100  $\mu$ lずつ加えて攪拌後、4℃で20時間反応した。反応後、各試験管に2.5%ウシ $\gamma$ -グロブリン溶液100  $\mu$ lおよび25%ポリエチレングリコール6000溶液500  $\mu$ lを加えて攪拌後、氷水中で20分間放置した。4℃、 $\times 2000g$ で15分間遠心分離を行い、上清を除去した後、

沈殿物中の残存放射活性量を $\gamma$ -カウンターARC-600(アロカ社製)で測定した。

【0020】

(6) 競合系RIAによるリング構造部分を有するBNPの測定

上記(4)と同様の検体をBNPリング構造部分を認識する抗体KY-BNP-IIを用いて競合系RIA法で測定した。測定方法はKY-BNP-IIを用い、上記(5)と同様の方法で行った。

【0021】

(7) 結果

上記(4)～(6)の方法で患者血漿を測定した結果を図1に示している。図中、縦軸は0時間におけるBNP免疫活性に対する残存活性率(%)、横軸は25℃における検体の放置時間を表す。白はシリコンで被覆したガラス採血管を、黒はガラス採血管を用い、また、四角はIRMA法、丸はカルボキシ末端部分を有するBNPの競合系RIA法、三角はリング構造部分を有するBNPの競合系RIA法を用いた測定結果を示している。

図1から、心疾患患者血漿中のBNPはシリコンで被覆したガラス採血管中に放置すると、24時間後では残存活性率は約80%であった。しかし、ガラス採血管中で放置すると、経時的にBNP残存活性率は低下し、24時間後では約2

0%であった。

以上の結果は、BNPはガラス採血管ではプロテアーゼなどによる分解を受け、活性に有意な減少が見られるが、シリコンで被覆することにより、活性に有意な減少は見られず、プロテアーゼなどの活性化が抑制されたことが明らかとなった。

#### 【0022】

##### 【発明の効果】

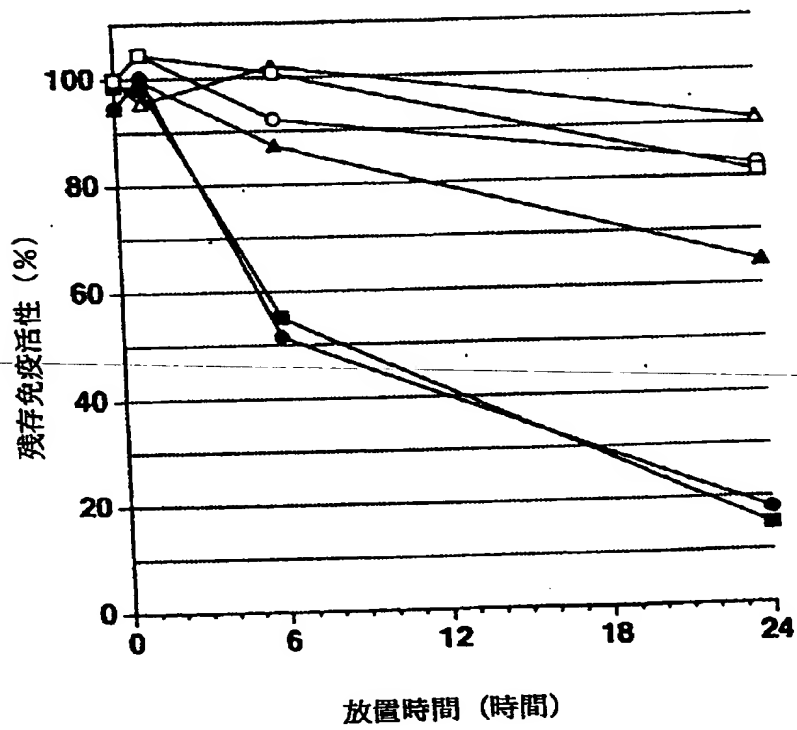
本発明の検体接触面がペプチド分解物質の活性化を抑制する物質で構成された容器を用いることにより、測定検体の採取法、保存法、および測定までの時間による影響を受けることなく、安定で、信頼性のある臨床データが得られる。さらに、採血試料に煩雑な処理を施すことなく測定することができるので、経済的で、簡便かつ安定な信頼性のある臨床データを提供し、心疾患の正確な診断に貢献し得る。

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】 ガラス採血管またはシリコンで被覆したガラス採血管中に25℃で保存した時の保存時間と、各種BNP測定方法で測定したBNP様物質の残存活性との関係を示すグラフ。

【書類名】 図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 BNP測定用検体の安定で簡便な採取方法の開発。

【解決手段】 哺乳類のナトリウム利尿ペプチド測定用検体の採取方法であって、検体接触面がペプチド分解物質の活性化を抑制する物質からなる容器を用いることを特徴とする方法。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000001926
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
【氏名又は名称】	塩野義製薬株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100103230
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号 塩野義 製薬株式会社特許部内
【氏名又は名称】	高山 裕貢
【代理人】	
【識別番号】	100108970
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号 塩野義 製薬株式会社 特許部内
【氏名又は名称】	山内 秀晃

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001926]

1. 変更年月日	1990年 8月23日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
氏 名	塩野義製薬株式会社